

重组人生长激素联合化疗对人肝癌原位移植瘤作用实验

赖佳明, 梁力建, 彭宝岗, 黎东明

(中山大学附属第一医院外科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨生长激素对原发性肝癌的作用及联合化疗的治疗效果。【方法】建立人原发性肝癌原位移植瘤模型, 并将 23 只荷瘤裸小鼠随机分成对照组(A 组), 化疗药物治疗组(B 组), 生长激素组(C 组), 生长激素联合化疗药物治疗组(D 组); 治疗 2 周, 观察各组裸小鼠的治疗效果。【结果】与实验前比较, 生长激素组裸小鼠体质量增加, 差异具统计学意义($P < 0.01$); 实验后, 裸小鼠肿瘤组织的平均质量、体积在化疗药物治疗组明显低于对照组($P < 0.01$), 在生长激素组明显高于其他组, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 而在生长激素联合化疗药物治疗组与对照组的比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。【结论】生长激素可能是通过直接促进肿瘤细胞 DNA 合成来刺激实体性肿瘤的生长, 生长激素联合有效化疗药物治疗肿瘤的方式可以降低生长激素对肿瘤的潜在危险性。

关键词 癌, 肝细胞/药物疗法; 小鼠, 裸; 生长激素

中图分类号 R735.7

文献标识码 A

文章编号 :1672-3554(2004)04-0315-04

Experimental Study of Effect of Recombined Human Growth Hormone Combined with Chemotherapy on Hepatocellular Carcinoma Implanted in Nude Mice

LAI Jia-ming, LIANG Li-jian, PENG Bao-gang, LI Dong-ming

(Department of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the effect of recombinant human growth hormone (rhGH) on the hepatocellular carcinoma implanted in nude mice and its efficacy in combining with chemotherapy.

【Methods】Human hepatocellular carcinoma model was established in nude mice. And 23 nude mice were divided into 4 groups: control group (Group A), chemotherapy group (Group B), rhGH group (Group C), and chemotherapy combined with rhGH group (Group D). The results of each group were observed in two weeks. 【Results】Body mass was significantly increased after rhGH therapy ($P < 0.01$). After the treatment, the average tumor mass and volume were significantly reduced in chemotherapy group compared with control group ($P < 0.01$); but they were significantly increased in rhGH group compared with the other groups ($P < 0.01$). It was no significant difference between the chemotherapy combined with rhGH group and the control group ($P > 0.05$). 【Conclusion】rhGH may stimulate growth of the solid tumor by directly promoting synthesis of tumor cell DNA. Using the rhGH combined with chemotherapy may reduce the potential danger of rhGH on growth of tumor.

Key words: carcinoma, hepatocellular/drug therapy; mice, nude; human growth hormone

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2004, 25(4): 315 - 318]

自从 20 世纪 60 年代初期利用来自尸体的生长激素 (growth hormone, GH) 进行了第一次临床试

验后^[1], 重组人类生长激素 (recombinant human growth hormone, rhGH) 广泛应用于替代治疗, 抗衰

收稿日期 2003-03-05

基金项目 广东省医学科学研究基金资助项目(B2001020)

作者简介 赖佳明(1968-), 男, 广东顺德人, 硕士, 主治医师. E-mail: laijiaming@163.com

老,营养不良、严重创伤、烧伤、感染及大手术前后的治疗,生长激素能明显减少围手术期的并发症和死亡率,为临床医生治疗危重病人提供有力的帮助。但生长激素潜在的促进细胞分化的作用可能会刺肿瘤生长,生长激素能否刺激实体性肿瘤的增长和转移,以及联合化疗药物治疗的效果如何还未见报道。本实验旨在探讨生长激素对原发性肝癌的作用及其临床应用的安全性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物模型 BALB/CA 裸小鼠,共 26 只,雄性,6~8 周龄,体质量 21~28 g(中山大学医学院动物中心提供),在 SPF(specific pathogen-free)条件下饲养。

1.1.2 人肝癌异位移植瘤制备 选用人肝癌 BeL-7402 细胞株(中山大学医学院动物中心细胞室提供),细胞总数为 $10 \times 10^6 / \text{mL}$,直接注射接种于 2 只裸小鼠颈侧和大腿皮下,共 4 点,每点 0.5 mL 细胞液,4 周后见肿块生长至 1~1.5 cm,处死小鼠,取出肿瘤组织,用取样器切成约 1 mm × 1 mm × 1 mm 备用。

1.1.3 原位移植瘤模型建立^[2] 将 24 只裸小鼠麻醉后开腹,用麻醉套管针在肝叶上刺孔,将切成小块的异位移植瘤块植入肝实质内,明胶海绵填塞压迫止血,缝合切口。除 1 只于术后第 1 天因腹腔内出血死亡外,其余 23 只小鼠均存活。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 手术后 3 周将 23 只荷瘤裸小鼠分别称量、标记,并随机分成 4 组,①对照组(A 组):5 只,腹腔内注射生理盐水 0.2 mL/d,每两天 1 次;腹部皮下注射,每天 1 次;②化疗药物治疗组(B 组):6 只,腹腔内注射丝裂霉素(mitomycin, MMC) 2.0 mg/(kg·d),每两天 1 次;③重组生长激素组(C 组):6 只,腹部皮下注射 rhGH(瑞士 Serono 公司产品) 1.0 U/(kg·d),每天 1 次;④重组生长激素组联合化疗药物治疗组(D 组):6 只,腹腔内注射 MMC 2.0 mg/(kg·d),每两天 1 次;腹部皮下注射 rhGH 1.0 U/(kg·d),每天 1 次。4 组小鼠均实验 2 周,停药 1 d,称体质量,处死小鼠。

1.2.2 观察指标 ①小鼠实验前后的一般生长情况,体质量变化;②小鼠肝肿瘤生长情况,有无侵

犯、种植或转移;③肝脏肿瘤重量:去除肿瘤旁其他肝组织后用分析天平称重。④肝肿瘤体积:沿肿瘤最长轴切开肿瘤,测量切面的长径(a)及短径(b),根据以下公式计算肿瘤体积(V/mm^3): $V = \pi/6 (a \times b/2)^3$;⑤肿瘤 AFP 测定:采用全自动图像分析系统(德国 Kontron/BAS2.5 型),将切除肿瘤标本用体积分数 10% 甲醛固定,石蜡包埋切片,作常规 HE 染色及 AFP 免疫组织化学染色,检测 AFP 的阳性单位(positive unit, PU)值^[3]。

1.3 统计学处理

所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS11.0 统计处理软件进行。组内实验前后比较采用配对 t 检验,各组间比较经方差齐性检验(其中“瘤体积”需经平方根转换),采用方差分析(One-way ANOVA 检验),两两多重比较采用 Least square significance(LSD)方法,检验水准,设 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 裸小鼠一般情况及体质量变化

在实验期间 23 只小鼠无死亡,一般反应良好,实验前后各组小鼠体质量的变化见表 1。如表 1 所示,可见各组小鼠实验前体质量比较无显著性差异($F = 1.545, P > 0.05$);在各组实验前后的比较中,虽然 A 组小鼠的体质量实验后比实验前有增加($t = -5.715, P < 0.05$),但 C 组小鼠的体质量增加更明显($t = -8.216, P < 0.01$)。

2.2 裸小鼠肝肿瘤生长情况

实验 2 周后处死并解剖小鼠,各组小鼠肝内均可见肿瘤生长,其中 A 组有 1 只小鼠肿瘤侵犯腹壁, C 组有 1 只小鼠可见肝内多个转移结节, 2 只小鼠肿瘤分别侵犯腹壁和膈肌, B、D 组均未发现侵犯、种植或转移。

2.3 裸小鼠肝瘤质量、体积

各组小鼠实验后肿瘤的质量比较见表 1,体积比较见表 1。从表中可见,瘤质量 D 组虽低于 A 组,但无显著差异($P > 0.05$),而 C 组则明显高于 A 组($P < 0.01$),肿瘤体积 B 组明显小于 A 组($P < 0.01$),C 组明显大于 A 组($P < 0.01$);而 C 组瘤质量、体积与其他 3 组比较均有明显增加($P < 0.01$)。

2.4 裸小鼠肿瘤组织 AFP

各组肿瘤组织 AFP 含量的比较见表 2。从表中可见,各组 AFP 的 PU 值之间的比较均无明显变化 ($F = 0.024$, $P > 0.05$), 肿瘤组织保持了 BeL -

7402 细胞株分泌 AFP 的特性;而 HE 病理染色检查仍为肝细胞癌,提示原位移植瘤模型能真实地反映原发性肝癌的特性。

表 1 各组裸鼠实验前后体质量、实验后瘤质量和体积的比较

Group	n	$m_{b,bi}/g$	$m_{b,at}/g$	$m_{t,pt}/g$	$V_{t,bi}/mm^3$
A	5	23.80 ± 3.03	24.60 ± 2.70 ¹⁾	0.26 ± 0.06 ⁴⁾	2361.57 ± 1323.69 ⁴⁾
B	6	26.50 ± 2.51	26.83 ± 2.79	0.21 ± 0.10 ^{3),4)}	734.05 ± 474.40 ^{3),4)}
C	6	23.33 ± 3.26	26.33 ± 4.03 ²⁾	0.40 ± 0.03 ³⁾	7303.52 ± 4443.28 ³⁾
D	6	25.50 ± 2.80	25.67 ± 2.25	0.23 ± 0.07 ⁴⁾	130.60 ± 1581.15 ⁴⁾
F		1.545	0.370	8.425	9.517
P		> 0.05	> 0.05	< 0.01	< 0.01

$m_{b,bi}/g$: body mass of before treatment; $m_{b,at}/g$: body mass of after treatment; $m_{t,pt}/g$: tumor mass of post-treatment; $V_{t,bi}/mm^3$: tumor volume of post-treatment. 1) Compared with before treatment, $t = -5.715$, $P < 0.05$; 2) Compared with before treatment; $t = -8.216$, $P < 0.01$; 3) Compared with group A, $q = -3.192$, $P < 0.01$; 4) Compared with group C, $q = -3.256$, $P < 0.01$

表 2 各组裸鼠肿瘤组织 AFP 比较

Group	n	PU / %
A	5	17.43 ± 26.95 ¹⁾
B	6	14.28 ± 24.77 ¹⁾
C	6	15.10 ± 21.24 ¹⁾
D	6	13.70 ± 24.24 ¹⁾
F		0.024
P		> 0.05

PU / %: positive unit; 1) Compared among four groups, $P > 0.05$

3 讨论

生长激素的作用主要表现为促进蛋白质合成,增加氨基酸摄取和促进细胞的增生,具有很强的合成代谢效应,可以明显改善病人恶液质状态。肝脏是生长激素的主要靶器官,正常肝细胞上有生长激素受体(GHR),生长激素与 GHR 结合,通过胰岛素样生长因子(IGF-1)介导,刺激肝细胞白蛋白 mRNA 的表达,促进白蛋白的合成;同时生长激素具有强烈的促进肝细胞 DNA 合成,刺激肝细胞生长、增殖和再生的作用。本实验结果发现,虽然实验后对照组和生长激素组小鼠的体质量与实验前均有明显增加,但生长激素组增加更为明显 ($P < 0.01$),提示生长激素有较强的促进生长的作用。

原发性肝癌(HCC)是一种高度恶性的肿瘤,生长激素在促进正常肝细胞生长、再生和肝功能恢复的同时,是否也会促进肝癌细胞的生长、转移和复发。生长激素是否具有促癌性,是目前临床争论的

焦点。Tacke 等^[4]曾分别对胃肠道肿瘤术后短期内使用生长激素的患者进行研究,结果证实术后短期内使用生长激素不会增加近期的死亡率和肿瘤复发的危险性,不影响 5 年生存率;术后短期内使用生长激素可以提高因手术创伤或化疗而降低的免疫功能和 NK 细胞的活性,使肿瘤患者体内潜在播散的肿瘤细胞得以被清除,而正是这种能够被大量清除的潜在播散的肿瘤细胞使手术治愈的肿瘤患者复发^[5]。因此,术后短期应用生长激素对免疫功能的潜在益处超过了它对肿瘤细胞潜在的刺激增殖作用,由于生长激素有促进合成代谢的效应,故可安全用于术后严重分解代谢的肿瘤患者。然而,临床上相当一部分患者术前已有严重营养不良或负氮平衡,因此在术前或术后复发的荷瘤患者治疗中,使用生长激素是否会刺激实体性肿瘤的生长,目前仍未见报道,本实验结果表明,应用生长激素组小鼠肿瘤的生长速度明显高于其他组,表现在肝肿瘤重量和体积的显著增加,以及对周围组织的侵犯和肝内转移灶;说明生长激素对肝实体性肿瘤有强烈的刺激生长作用,在临床上有可能促使肝癌增大、转移或复发。虽然近年来的临床研究未能证实应用生长激素会引起肿瘤复发,但这些研究多为回顾性分析或追踪时间不够长,生长激素与原发性肝癌的确切关系目前尚缺乏实验与临床大样本的前瞻性研究。因此,肿瘤患者必须要证实肿瘤已作根治性切除后才能应用生长激素,对于不准备接受手术或术后复发的荷瘤患者,使用生长激素应谨慎。

Makino 等^[6]证实生长激素能通过 GHR 促进肝

细胞增殖启动基因 *c-myc* 表达,从而使肝细胞从 G_0 期进入 G_1 期,促进肝再生。但 Chang 等^[7]通过检测原发性肝癌患者 GHR,发现肝癌细胞及癌旁肝硬化组织缺乏 GHR;因此,生长激素对肿瘤的作用途径可能是通过直接刺激肿瘤细胞 DNA 合成^[8],促进肿瘤细胞蛋白 mRNA 表达,提高肿瘤细胞分裂增殖能力,从而促进肿瘤的分化、生长来实现的。国内有学者研究发现^[9],生长激素能促进结肠癌细胞从静止细胞期进入增殖周期,细胞生长比率增加,生长激素使进入 DNA 合成期的肿瘤细胞增多,而此时肿瘤细胞对化疗药物最为敏感,故推测生长激素与化疗药物合用不仅可以增加机体对化疗的耐受性,而且可以起到增敏化疗的协同作用,这与肿瘤患者使用营养支持可促进肿瘤细胞由静止期进入分裂期,增加肿瘤细胞对化疗药物敏感性的理论相类似^[10]。与化疗药物合用,可加强化疗对肿瘤细胞的杀伤能力,有“引蛇出洞,后而斩之”的效果。本实验使用的 MMC 是抗肿瘤抗生素,实验证明有较强的抗肿瘤效果,故联合使用似乎可以加强 MMC 的疗效,但实验结果提示联合有效化疗药物使用生长激素,与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),说明两者联合使用并不能增加疗效,但却能有效降低生长激素刺激肿瘤生长的作用(与 rhGH 组比较, $P < 0.01$),使机体能够保持一种相对平衡的状态,减少肿瘤转移和复发的可能性。

综上所述,生长激素具有促进蛋白质合成的作用,能迅速纠正负氮平衡,改善患者的整体营养状况,提高机体的免疫功能,使患者能够很好耐受各种抗肿瘤治疗。但生长激素有潜在的刺激实体性肿瘤生长的作用,会促进实体性肿瘤的增殖、转移和对周围组织的侵犯,因此,对于术前或术后复发的荷瘤患者,应尽量避免使用。而对于必须使用生长激素的肿瘤患者,最好在无转移证据,手术又能做到根治性切除或与有效的抗肿瘤药物同时使用,虽然联合化疗并不能有效治疗实体性肿瘤,但能降

低因使用生长激素而引起的刺激肿瘤生长的危险性和改善患者的全身情况。

参考文献:

- [1] Tattersall R. A history of growth hormone[J]. *Horm Res*, 1996, 46(4-5): 236-47.
- [2] 彭宝岗,丁健,吕明德,等. 人肝癌裸小鼠原位移植模型的建立与鉴定[J]. *中山医科大学学报*, 1997, 17 增刊: 7-10.
- [3] 申洪. 免疫组织化学染色定量方法研究(III)[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 1995, 4(1): 89-92.
- [4] Tacke J, Bolder U, Herrmann A, et al. Long-Term risk of gastrointestinal tumor recurrence after postoperative treatment with recombinant human growth hormone[J]. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2000, 24(3): 140-4.
- [5] Jauch K W, Heiss M M, Gruetzner U, et al. Prognostic significance of bone marrow micrometastases in patients with gastric cancer [J]. *J Clin Oncol*, 1996, 14(6): 1810-7.
- [6] Makino R, Hayashi K, Sugimura T. C-myc trascript is induced in rat liver at a very early stage of regeneration or by cycloheximide treatment [J]. *Nature*, 1984, 310 (5979): 697-8.
- [7] Chang T C, Lin J J, Yu S C, et al. Absence of growth-hormone receptor in hepatocellular carcinoma and cirrhotic liver[J]. *Hepatology*, 1990, 11(1): 123-6.
- [8] Kaulsay K K, Zhu T, Bennett W, et al. The effects of autocrine human growth hormone(hGH) on human mammary carcinoma cell behavior are mediated via the hGH receptor[J]. *Endocrinology*, 2001, 142(2): 767-77.
- [9] 祈晓平,黎介寿,陈彻. 人生长激素对人结肠癌细胞 LS-174-T 增值周期的影响 [J]. *肠内与肠外营养*, 2001, 8(1): 8-10.
- [10] 陈嘉勇,甘平,徐鹏远,等. 生长激素对老年消化道肿瘤患者术后蛋白分解代谢和免疫功能的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2000, 20(3): 162-3.

(编辑 张敏瑞)